

发酵生产脂肪酶的菌株筛选及其应用

刘晶, 时敏, 徐速, 于殿宇, 江连洲, 任运宏*

(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 采用从大庆日月星油厂附近的土壤中筛选得到产脂肪酶的菌株 *xjA*, 在固态发酵的条件下生产脂肪酶, 并将所产脂肪酶应用于合成共轭亚油酸甘油酯。本实验利用单因素和正交试验方法确定产脂肪酶的最佳固态发酵条件: 在种龄 36h 的情况下, 碳源(麸皮)与氮源(豆粕)质量比($m_{\text{麸皮}}:m_{\text{豆粕}}$)为 1:4、 $V_{\text{培养基}}:V_{\text{加水}}$ 1:1、接种量 0.3%、发酵温度 29℃、发酵时间 3d。在此条件下进行固态发酵, 固态培养基中脂肪酶的活力最高, 可达 1450U/g; 所得脂肪酶用于合成共轭亚油酸甘油酯, 产物中共轭亚油酸(CLA)接入率可达到 13.6%。

关键词: 脂肪酶; 固态发酵; 酶活力; 共轭亚油酸甘油酯;

Screening and Application of a Lipase-Producing Strain

LIU Jing, SHI Min, XU Su, YU Dian-yu, JIANG Lian-zhou, REN Yun-hong*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In this study, a lipase-producing strain, named as *xjA*, was isolated from soil near Riyuexing oil factory in Daqing. The solid-state fermentation conditions for lipase production by the strain were optimized using one-factor-at-a-time and orthogonal array design methods. Meanwhile, the prepared lipase was used to synthesize conjugated linoleic acid glyceride. The results indicated that the optimal fermentation conditions were wheat bran/soybean meal mass ratio of 1:4, culture medium/adding water volume ratio of 1:1, fermentation temperature of 29 °C, inoculation amount of 0.3%, and fermentation time of 3 days. Under these conditions, the activity of lipase was up to 1450 U/g. The load rate of conjugated linoleic acid (CLA) in the conjugated linoleic acid glyceride synthesized using the obtained lipase was 13.6%.

Key words: lipase; solid-state fermentation; lipase activity; conjugated linoleic acid glyceride

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0126-05

脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3), 又称甘油酯水解酶, 可作用于脂肪分子中的羧酸酯键, 催化脂肪水解为脂肪酸和二酰甘油、单酰甘油或甘油, 也可催化甘油酯及水不溶性酯类的醇解、酯化、酯交换以及合成等反应^[1-2]。催化反应不需要辅酶, 且反应条件温和、副产物少, 反应通常具有高度立体异构专一性和化学选择性^[3-4]。

与国外相比, 我国对脂肪酶的研究和开发较晚, 而且工业化的微生物脂肪酶制剂种类有限, 但产脂肪酶的微生物在自然界中分布很广, 据估计, 有 65 个属的微生物能产脂肪酶, 而实际上产脂肪酶的微生物在自然界的分布远远超过于此^[5]。因此, 筛选具有新特性的活力高、产量高及成本低的脂肪酶菌种, 同时开发脂肪

酶新的应用领域是十分必要的。随着遗传工程的应用, 酶的固定化技术及界面酶学和非水酶学的研究与应用, 微生物脂肪酶将使诸多的传统产业面临新的挑战^[6]。

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)是由亚油酸衍生的一组亚油酸异构体, 是普遍存在于人和动物体内的营养物质。由于自然界中 CLA 的含量较低, 不能满足人们的需求。目前 CLA 的合成, 一般以亚油酸或富含亚油酸的植物油如葵花籽油、蓖麻油或红花籽油等为原料, 采用化学、生物的方法进行异构化^[7]。常见的制备方法主要有: 碱性异构化法、混合溶剂法、酶催化亚油酸异构化法、羟基脂肪酸脱水以及近年来兴起的在超临界 CO₂ 状态下酶法合成 CLA、微生物合成法等^[8-11]。共轭亚油酸不仅具有多种生理功能还具有一定

收稿日期: 2011-10-11

基金项目: 国家“863”计划项目(2010AA101503)

作者简介: 刘晶(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向粮油加工。E-mail: LiuJing860530@sina.com

* 通信作者: 任运宏(1959—), 男, 高级实验师, 本科, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: yhren4321@163.com

的保健作用^[12]。近年来,国内学者对酶法制备共轭亚油酸甘油酯的研究较多,酶法相对于化学法成本较高,但由于反应条件温和,反应过程中无有机溶剂的加入,是一种绿色的生产方法。

由于国内产脂肪酶的方法大多还是液态产脂肪酶,固态发酵产脂肪酶的报道较少,因此,本实验充分利用廉价农产品加工副产物,降低脂肪酶原料生产成本;利用固态发酵产脂肪酶,相对液体深层发酵生产脂肪酶,节约设备投资和运行费用等优势。从大庆日月星油厂附近采集到的土样中分离筛选到一株产脂肪酶菌株,利用豆粕、麸皮为原料固态发酵制备脂肪酶。在实验室水平上,摸索一套适宜固态发酵脂肪酶的工艺条件,为应用于工业化生产共轭亚油酸甘油酯提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌种与试剂

菌种:从大庆日月星油厂附近采集的土样中分离纯化而来,根据菌落生长速度较快,菌落颜色起初白色、黄色,后变为淡绿褐色,直径3~4cm,分生孢子头放射状,顶囊近球形,生长最适温度为30℃左右,40℃时仍能生长^[13-14],初步鉴定为产脂肪酶的实验用菌株 *xjA*。

花生油,鲁花5S压榨一级花生油;共轭亚油酸 青岛澳海有限公司;橄榄油 广东雅娜集团有限公司;酵母膏、蛋白胨、琼脂 中国医药集团上海公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 培养基

脂肪酶筛选培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1、 K_2HPO_4 1、 KCl 0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01、琼脂 18,橄榄油-聚乙烯醇乳化液(体积比1:3)混合液。

种子培养基:豆饼粉4g、淀粉0.6g、 Na_2HPO_4 0.2g、 K_2SO_4 0.3g、 MgSO_4 0.3g、 FeSO_4 0.015g、 CaCO_3 0.5g,自来水100mL,并调节pH值至7.5,121℃灭菌20min。

产酶培养基:将新鲜的麸皮粉碎后和豆粕按一定质量比混合,然后加入到250mL三角烧瓶中,再加入一定比例的自来水,搅和均匀后121℃高压灭菌15min,备用。

1.3 仪器与设备

无菌超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司;恒温水浴锅 上海一恒科技有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅 上海医用核子仪器厂;恒温培养箱 广东仪器厂;移液器 德国艾本德股份公司;电子天平 上海民桥精密仪器有限公司;低温高速离心机 日本日立公司;

夹套式具塞反应器 自制。

1.4 方法

1.4.1 粗酶液的制备

取30g鲜曲,加蒸馏水150mL,将酶曲充分捣碎后(组织捣碎机捣碎)于4℃条件下缓慢搅拌,浸提2h,4层纱布过滤,4400r/min离心20min,后的上清液即为粗酶液。

1.4.2 酶活力测定

采用改进的橄榄油乳化法^[15]定量测定。以分解底物(橄榄油)释放出 $1\mu\text{mol}/\text{min}$ 游离脂肪酸所需酶量定义为1个碱性脂肪酶活力单位(U)。

1.4.3 固态发酵条件的优化

选择麸皮和豆粕为培养基的碳源和氮源,将种龄为36h的菌液以一定接种量接种到发酵温度、发酵时间一定及麸皮和豆粕不同质量比混合的培养基中,发酵产脂肪酶,并对固态发酵条件进行旋转正交试验优化。

1.4.4 共轭亚油酸总接入率的测定分析^[16]

称取反应后产物50mg置于10mL试管内,加入0.4mol/L的氢氧化钾-甲醇溶液2mL,置于漩涡混匀器上混匀15s。加入10mL色谱纯正己烷后置于漩涡混匀器上30s,静置20min后取上层清液。以供气相色谱分析,采用面积归一化法定量。

2 结果与分析

2.1 固态发酵条件的确定

2.1.1 碳氮比对产脂肪酶的影响

影响产脂肪酶的主要因素有培养基中碳氮比、发酵时间及发酵温度等因素,本实验选择麸皮和豆粕为培养基的碳源和氮源,在接种量0.3%、发酵温度29℃、 $V_{\text{培养基}}:V_{\text{加水量}}$ 1:1、发酵时间3d的条件下,通过添加不同比例的麸皮和豆粕,考察培养基中碳氮比对脂肪酶活力的影响,结果见表1。

表1 不同碳氮比对产脂肪酶的影响

Table 1 Effect of wheat bran/soybean meal mass ratio on lipase production

$m_{\text{麸皮}}:m_{\text{豆粕}}$	脂肪酶活力/(U/g)	产率/(U/(g·d))
0:5	1380	345
1:4	1450	362
2:3	1134	283
3:2	1094	273
4:1	674	168
5:0	640	160

由表1可知,该菌株在较低的碳氮比条件下可产生较高酶活的脂肪酶,且在 $m_{\text{麸皮}}:m_{\text{豆粕}}$ 为1:4时酶活力最高,

达到 1450U/g, 故应选择 $m_{\text{麸皮}}:m_{\text{豆粕}}$ (即碳氮比) 为 1:4 为发酵的最佳碳氮比。

2.1.2 培养基含水量对产脂肪酶的影响

在碳氮比 1:4、接种量 0.3%、发酵温度 29℃、发酵时间 3d 时, 通过添加不同含量的水分, 考察培养基含水量对脂肪酶活力的影响, 结果见表 2。

表 2 培养基含水量对产脂肪酶的影响

Table 2 Effect of water content on lipase production

$V_{\text{培养基}}:V_{\text{加水量}}$	1:0.5	1:1	1:1.5	1:2	1:2.5
相对酶活力 / %	50	100	52	45	35

固态发酵中加水量过多不利于培养基的通风和散热, 而加水较少无法满足所需要的湿度。由表 2 可知, 培养基与加水量的体积比为 1:1, 此时所得脂肪酶相对酶活最高。

2.1.3 接种量对产脂肪酶的影响

在碳氮比 1:4、 $V_{\text{培养基}}:V_{\text{加水量}}$ 1:1、发酵温度 29℃、发酵时间 3d 条件下, 考察不同接种量对产酶的影响, 并在培养 3d 后进行取样测定酶活, 以此考察接种量对产酶的影响, 结果见图 1。

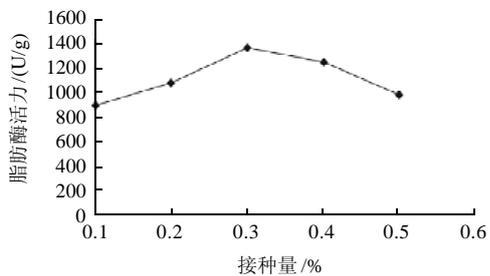


图 1 接种量对产脂肪酶的影响

Fig. 1 Effect of inoculation amount on lipase activity

由图 1 可知, 当接种量较低时由于菌体数量有限导致产脂肪酶的速度慢, 故酶活力较低, 当接种量为 0.3% 时, 菌体生长旺盛, 所产脂肪酶活力最高, 而当接种量超过 0.3% 时酶的活力逐渐降低, 菌体大量生长形成竞争, 不利于产酶。故应选择 0.3% 为最佳接种量。

2.1.4 发酵温度对产脂肪酶的影响

在碳氮比 1:4、 $V_{\text{培养基}}:V_{\text{加水量}}$ 为 1:1、接种量 0.3%、发酵时间 3d 条件下, 考察不同发酵温度对产酶的影响, 并在培养 3d 后进行取样测定酶活, 以此考察温度对产脂肪酶的影响, 结果见图 2。

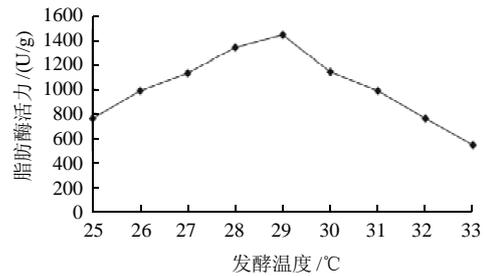


图 2 发酵温度对产脂肪酶的影响

Fig. 2 Effect of fermentation temperature on lipase activity

由图 2 可知, 当发酵温度较低时由于菌体生长缓慢导致产脂肪酶的速度慢, 故酶活力较低, 当温度为 29℃ 时, 菌体生长旺盛, 所产脂肪酶活力最高, 而当温度超过 29℃ 时酶的活力逐渐降低, 故应选择 29℃ 为最佳培养温度。

2.1.5 发酵时间对产脂肪酶的影响

在碳氮比 1:4、 $V_{\text{培养基}}:V_{\text{加水量}}$ 1:1、接种量 0.3%、发酵温度 29℃ 条件下, 考察不同发酵时间对产酶的影响, 并在培养过程中定时进行取样测定酶活力, 以此考察发酵时间对产脂肪酶的影响, 结果见图 3。

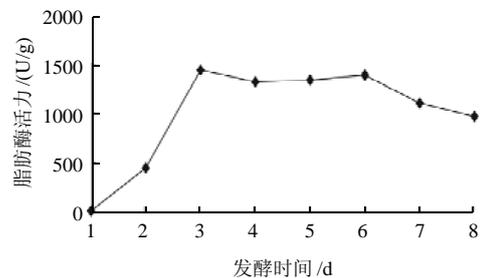


图 3 发酵时间对产脂肪酶的影响

Fig. 3 Effect of fermentation time on lipase activity

由图 3 可知, 发酵初期脂肪酶活力逐渐上升, 培养到第 3 天时, 产脂肪酶量最大, 随着培养时间的增加, 脂肪酶产量在减小, 酶活也在逐渐降低, 故应选择 3d 为最佳发酵时间。

2.2 正交试验优化

根据单因素试验的结果, 培养基中碳氮比对酶活力的影响明显, 因此不作为本试验正交试验变量, 因此选择影响产酶因素含水量、接种量、发酵温度、发酵时间作为正交因素。选用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 以得到最有利于产脂肪酶的固态发酵工艺参数。正交试验结果见表 3。

表3 固态发酵产脂肪酶正交试验设计及结果
Table 3 Orthogonal array design arrangement and results

试验号	A 接种量/%	B $V_{培养基}:V_{加水量}$	C 发酵温度/℃	D 发酵时间/d	脂肪酶活力/(U/g)
1	1(0.2)	1(1:1.5)	1(28)	1(2)	980
2	1	2(1:1)	2(29)	2(3)	1300
3	1	3(1:2)	3(30)	3(4)	950
4	2(0.3)	1	2	3	1400
5	2	2	3	1	1150
6	2	3	1	2	1350
7	3(0.4)	1	3	2	1000
8	3	2	1	3	1200
9	3	3	2	1	1200
k_1	1076.667	1126.667	1176.667	1110.000	
k_2	1300.000	1216.667	1300.000	1216.667	
k_3	1133.333	1166.667	1033.333	1183.333	
R	223.333	90.000	266.667	106.667	

由表3可知,对固态发酵产脂肪酶活力影响的因素主次顺序为:发酵温度>接种量>发酵时间> $V_{培养基}:V_{加水量}$ 。最佳组合为 $A_2B_2C_2D_2$,即接种量0.3%、 $V_{培养基}:V_{加水量}$ 为1:1、发酵温度29℃、发酵时间3d。按照正交试验得出的最佳参数进行验证,此时,固态培养基中脂肪酶的活力最高,可达1450U/g。

2.3 自制脂肪酶应用于合成共轭亚油酸甘油酯

在无溶剂体系中,用上述优化结果所产脂肪酶代替脂肪酶Novozym 435催化CLA和花生油反应合成CLA-SL。以CLA总接入率为指标,在底物CLA与花生油物质的量比为3.5:1,体系水分添加量1.5%、酶用量3%、反应温度60℃、反应时间32.5h的条件下合成共轭亚油酸甘油酯^[16]。在此参数下进行验证,结果显示CLA接入率可达13.6%(图4~6)。

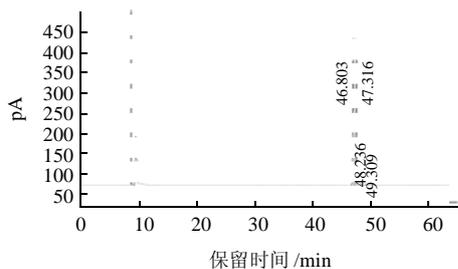


图4 CLA标准品的GC图
Fig.4 GC analysis of CLA standard

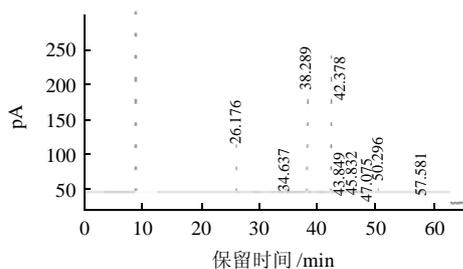


图5 原料花生油的GC图
Fig.5 GC analysis of raw peanut oil

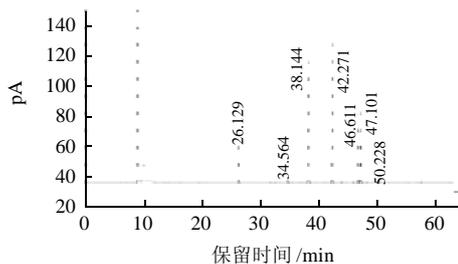


图6 富含CLA的花生油的GC图
Fig.6 GC analysis of peanut oil rich in CLA

3 讨论

采用从大庆日月星油厂附近的土壤中筛选得到产脂肪酶的菌株 xjA (初步鉴定为米曲霉),在固态发酵的条件下生产脂肪酶,并将所产脂肪酶应用于合成共轭亚油酸甘油酯。利用单因素和正交试验方法确定了产脂肪酶的最佳固态发酵条件:在种龄36h的情况下,麸皮和豆粕的质量比1:4、培养基与加水量体积比1:1、接种量0.3%、发酵温度29℃、发酵时间3d。此时,固态培养基中脂肪酶的活力最高,可达1450U/g。在最优发酵条件下制得反应产物共轭亚油酸甘油酯中CLA接入率可达13.6%。自制脂肪酶比脂肪酶Novozym 435的催化结果要低,由于本实验所用酶活力不及脂肪酶Novozym 435,但筛选的脂肪酶菌株可作为今后生产和工业化生产上的出发菌株,为脂肪酶基因的克隆、工程菌的构建奠定基础,进一步应用于合成共轭亚油酸甘油酯也有一定的工业化意义。

对米曲霉的报道中大多数是关于其产蛋白酶的研究,米曲霉产脂肪酶的报道较少,王小花等^[17]对米曲霉产脂肪酶进行了研究,确定了米曲霉产脂肪酶的最适培养条件,并将本结果与之进行比较,筛选出最佳的碳源为麦芽糖与以前有关米曲霉培养条件的研究结果有所不同。而邓琳芬等^[18]对米曲霉产脂肪酶的发酶条件进行了优化,对影响米曲霉产脂肪酶多种因素的优化研究。而本实验是在此基础上对培养条件上进一步创新,选择固态发酵的方法生产脂肪酶,并对固态发酵条件优化研究,以确定米曲霉产脂肪酶的最佳固态发酵条件。

参考文献:

- [1] 张树政. 酶制剂工业: 下册[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 马歌丽, 彭新榜, 陈丽超. 扩展青霉产碱性脂肪酶发酵条件的研究[J]. 饲料工业, 2006, 27(12): 21-23.
- [3] FRED V R, ROGER A S. Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases[J]. Tetrahedron, 2004, 60(33): 501-519.
- [4] ALFONSO I, GOTOR V. Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates[J]. Chem Soc Rev, 2004, 33(4): 201-209.

- [5] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 655-670.
- [6] 谈重芳, 王雁萍, 陈林海, 等. 微生物脂肪酶在工业中的应用及研究进展[J]. 食品工业科技, 2006, 27(7): 193-195.
- [7] 吴天祥, 李红海, 杨丰科. 红花油制取共轭亚油酸的研究[J]. 精细与专用化学品, 2007, 15(24): 23-25.
- [8] 王武, 郑钰, 张新保, 等. 超临界 CO₂ 在酶法合成共轭亚油酸中的应用[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(21): 9853-9856.
- [9] 黄永. 从植物种子中提取共轭亚油酸的工艺: 中国, 200610021595.4 [P]. 2008-02-20.
- [10] 吾满江·艾力, 文彬, 马莉, 等. 使用混合溶剂合成共轭亚油酸的方法: 中国, 01145341.9[P]. 2005-07-27.
- [11] 严梅荣, 顾华孝. 共轭亚油酸合成方法的研究进展[J]. 中国油脂, 2003, 28(7): 40-42.
- [12] 塔娜, 李佳, 魏波, 等. 共轭亚油酸对妊娠期糖尿病大鼠胎盘脂联素基因表达影响的研究[J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(5): 339-342.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 66-116.
- [14] 中国科学院微生物研究所《常见与常用真菌》编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1973: 52-177.
- [15] ABRAMIC M, LESCIC I, KORICA T, et al. Purification and properties of extracellular lipase from *Sreptomyces rimosus*[J]. Enzyme Microbial Technol, 1999, 25(6): 522-529.
- [16] 李默馨, 刘晶, 周晓丹, 等. 超临界状态下直接酯化法制备共轭亚油酸甘油酯的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(10): 34-35.
- [17] 王小花, 洪枫, 朱利民, 等. 米曲霉产胞外脂肪酶培养条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 25-28.
- [18] 邓琳芬, 郑毅, 王娅, 等. 米曲霉产脂肪酶的发酵条件优化[J]. 海峡科学, 2010, 46(10): 12-14.